

齐素敏,冉新炎,韩广泉,等. 哈茨木霉 NBL-Z1 定殖动态及对草莓根腐病防治效果[J]. 江苏农业科学,2021,49(17):124-127.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.17.022

哈茨木霉 NBL-Z1 定殖动态及对草莓根腐病防治效果

齐素敏,冉新炎,韩广泉,陶 宁,陈丹丹,李圆圆,王丽荣

(山东碧蓝生物科技有限公司/泰安市植物微生态制剂重点实验室,山东泰安 271000)

摘要:本研究测定哈茨木霉 NBL-Z1 菌株无菌发酵滤液对 5 种病原菌的拮抗活性,并检测该菌的定殖能力及对草莓根腐病的防治效果,以期筛选出对病原真菌具有良好拮抗效果、安全、高效的生防菌。结果表明,哈茨木霉 NBL-Z1 菌株无菌发酵滤液对 5 种供试病原真菌有较强的拮抗作用,处理 96、144 h,NBL-Z1 菌株对尖孢镰刀菌菌丝生长的抑菌率均为 100.00%;接种后 28 d,菌株 NBL-Z 在草莓根表定殖数量达到最大,为 8.10×10^7 CFU/g;NBL-Z1 菌株对盆栽草莓根腐病的防效为 65.6%,同时可促进盆栽草莓植株生长,提高果实产量。研究表明,NBL-Z1 菌株能有效防治草莓根腐病并促进草莓植株生长,具有较高的潜在应用价值。

关键词:哈茨木霉;拮抗活性;尖孢镰刀菌;定殖能力;草莓根腐病

中图分类号:S436.68⁺4

文献标志码:A

文章编号:1002-1302(2021)17-0124-04

木霉菌(*Trichoderma* spp.)属半知菌亚门木霉属,该类菌适应力强,分布广泛,是一类重要的生防真菌^[1],常见的木霉有绿色木霉(*Trichoderma viride*)、哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)、棘孢木霉(*Trichoderma asperellum*)、长枝木霉(*Trichoderma longibrachiatum*)等。据报道,木霉菌已成功用于防治番茄灰霉病^[2]、番茄枯萎病^[3]、黄瓜枯萎病^[4]、花生根腐病^[5]等植物病害,该类菌对植物病害起到防控作用的机制主要归结于竞争^[6]、诱导抗性^[7-8]、重寄生^[9]、抗生等。

哈茨木霉(*T. harzianum*)是一种常见的木霉菌,该菌对多种病原菌具有较强的抑制效果。Zhang 等研究发现,哈茨木霉对尖孢镰刀菌菌丝生长抑制率可达 70.99%^[10]。据报道,哈茨木霉对尖孢镰刀菌、核盘菌、链格孢菌等植物病原菌具有明显的拮抗作用^[11]。Swehla 等研究了哈茨木霉对芝麻茎点枯病菌的抑制效果,结果表明菌丝体生长抑制率为 76.96%^[12]。有关哈茨木霉对尖孢镰刀菌的抑制作用,及哈茨木霉在草莓根系定殖能力及对草莓根腐

病的防治效果的研究较少。本研究以哈茨木霉 NBL-Z1 菌株为试验材料,通过室内拮抗试验发现该菌对 5 种供试病原真菌均具有抑制效果,后研究 NBL-Z1 菌株在草莓根际的定殖能力,以及其对草莓根腐病的防治效果和促生作用,以期防治草莓根腐病等土传病害的生防菌剂的开发应用提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

哈茨木霉 NBL-Z1 菌株于土壤中分离纯化获得。该菌株目前保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心,编号为 CGMCC19602。

PDB 培养基:马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,蒸馏水 1 000 mL。

PDA 培养基:马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 20 g,蒸馏水 1 000 mL。

1.2 菌株 NBL-Z1 无菌发酵滤液抑菌活性测定

将 NBL-Z1 菌株接种到 PDB 培养基中,于 28 ℃、180 r/min 恒温摇床中培养 120 h 后,10 000 r/min 离心,用 0.22 μm 微孔滤膜过滤得无菌发酵滤液,按体积 1:9 的比例将其与冷却至 50 ℃左右的灭菌 PDA 培养基混匀,倒入灭过菌的平皿中,待平皿冷凝后将直径为 9 mm 的病原真菌菌饼置于平板中央,以普通 PDA 培养基平板为对照,于 28 ℃光照培养箱中培养,用十字交叉法分别于 96、144 h 测量菌落直径,并计算相对抑菌率。相对抑菌率=(对照

收稿日期:2020-12-15

基金项目:山东省 2018 年重点研发计划(编号:2018JHZ012);泰山产业领军人才(编号:鲁政办字[2018]246 号);2017 年“外专双百计划”(编号:鲁政办字[2017]144 号);2020 年度山东省重点扶持区域引进急需紧缺人才项目(编号:泰发改区域[2020]352 号)。

作者简介:齐素敏(1989—),女,山东沂源人,硕士,助理研究员,主要从事植物微生态制剂的研发工作。E-mail: qsm20095089@126.com。

菌落直径 - 处理菌落直径) / (对照菌落直径 - 菌饼直径) $\times 100\%$ 。

1.3 菌株 NBL-Z1 在草莓根系定殖量的检测

本试验于 2019 年 12 月在山东省泰安市宁阳县乡饮乡 (116.80°E, 35.77°N) 巴夫生态大棚进行。

将 NBL-Z1 菌株于 PDB 培养液中培养 120 h 后, 用 4 层灭菌滤纸过滤, 加无菌水制成分生孢子悬浮液, 用血球计数板计数调整浓度为 1.0×10^7 CFU/mL。每株草莓灌根接种 10 mL 该菌孢子悬浮液。分别于接种 NBL-Z1 菌株后 1、7、14、21、28、35 d 取样进行定殖量的检测。切取草莓根组织, 转移至离心管中。向离心管中加入 1 mL $1 \times$ PBS 和玻璃珠若干, 依次超声振荡 1 min, 漩涡振荡 1 min, 冰浴 1 min, 重复 3 次。将获得的菌悬液梯度稀释 $10 \sim 10^6$ 倍, 吸取 200 μ L 菌悬液涂布于 PDA 培养基平板, 于 28 $^{\circ}$ C 培养 120 h, 记录平板上的菌落数, 计算菌株 NBL-Z1 在草莓根系的定殖量。

1.4 菌株 NBL-Z1 的防病作用

试验设 3 个处理: 对照 (CK)、单接病原菌 (P)、同时接种病原菌和 NBL-Z1 菌株 (P + NBL-Z1)。每个处理重复 20 棵番茄。分别刮取 PDA 培养基平板上 28 $^{\circ}$ C、培养 120 h 的尖孢镰刀菌孢子和 NBL-Z1 菌株, 分散到 0.1% 吐温-80 溶液中制成孢子悬液, 调整病原菌和生防菌的浓度至 1.0×10^7 CFU/mL。采取伤根灌注法^[13]同时接种病原菌和生防菌, 各菌株接种量均为每棵 10 mL。接种 50 d 后挖取植株, 统计发病程度, 计算病情指数、防效, 测定植株鲜质量、单株产量及叶绿素含量 (SPAD 值)。

根腐病发病程度分为 6 级: 0 级为根系未发病; 1 级为根系发病率 $\leq 30\%$, 叶片正常; 2 级为 $30\% <$ 根系发病率 $\leq 60\%$, 叶片正常; 3 级为 $60\% <$ 根系发病率 $\leq 80\%$, 叶片变黄; 4 级为根系发病率 $> 80\%$, 叶片枯萎; 5 级为整株死亡, 叶片干枯^[14]。

病情指数 = $[\sum (\text{各病级株数} \times \text{各病级代表值}) / (\text{总株数} \times \text{最高病级代表值})] \times 100$;

防效 = (对照病情指数 - 处理病情指数) / 对照病情指数 $\times 100\%$ 。

1.5 数据统计与分析

采用 Excel 2010 和 SPSS 19.0 软件进行 Duncan's 显著性分析和 Probit 法回归分析。

2 结果与分析

2.1 菌株 NBL-Z1 对病原菌的抑制作用

从表 1 可以看出, NBL-Z1 菌株无菌发酵液对

5 种病原真菌菌丝生长均具有较强的抑制作用。NBL-Z1 菌株对尖孢镰刀菌菌丝生长抑制效果最好, 处理 96、144 h, 抑菌率均为 100.00% (图 1)。处理 96 h 后, NBL-Z1 菌株对链格孢的菌丝生长抑菌率达 94.61% (图 2), 但对立枯丝核菌的抑菌率仅为 49.17%。培养 144 h, NBL-Z1 菌株对链格孢的菌丝生长抑菌率为 90.38%, 对其他病原真菌的菌丝生长抑菌率为 56.52% ~ 82.54%。总体来看, NBL-Z1 菌株对 5 种病原真菌 96 h 的拮抗效果优于 144 h。

表 1 菌株 NBL-Z1 对病原菌的抑制作用

病原菌	抑菌率 (%)	
	96 h	144 h
尖孢镰刀菌	100.00	100.00
链格孢	94.61	90.38
层出镰刀菌	87.21	82.54
桔青霉菌	81.64	78.75
立枯丝核菌	49.17	56.52

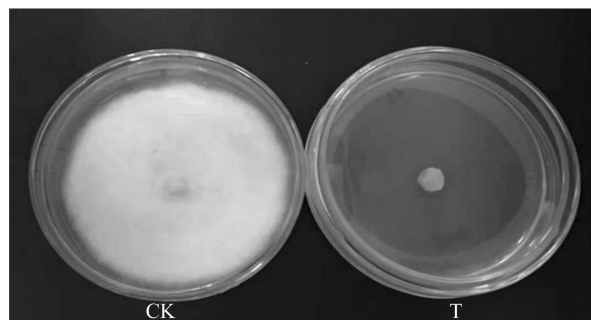


图 1 菌株 NBL-Z1 对尖孢镰刀菌抑制效果 (96 h)

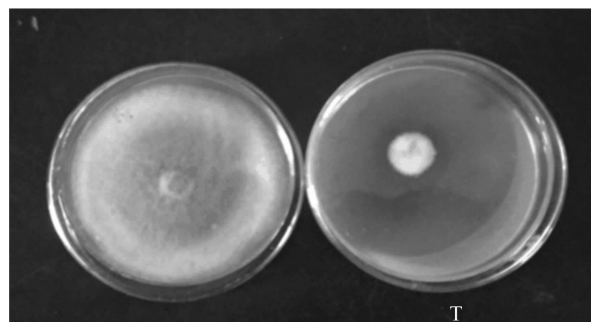


图 2 菌株 NBL-Z1 对链格孢抑制效果 (96 h)

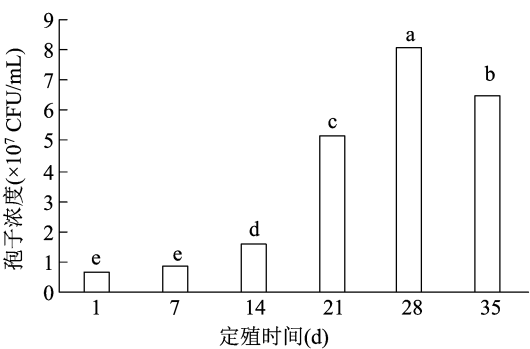
2.2 菌株 NBL-Z1 在草莓根系的定殖

植物根际促生菌在植物根际定殖能力是影响其生防效果的重要原因之一, 是发挥其有益功能的前提。为了检测 NBL-Z1 菌株在草莓根表的定殖, 在 NBL-Z1 菌株接种后的 1、7、14、21、28、35 d 采集根系样品, 分离并培养定殖于根表的 NBL-Z1 菌株,

统计其定殖量。由图 3 可知,接种后 1 d,NBL-Z1 菌株在草莓根表的定殖量为 0.68×10^7 CFU/mL,随着草莓的生长,该菌株在草莓根表的定殖量逐渐增加,接种后 28 d,NBL-Z1 菌株的定殖量达到最大,为 8.10×10^7 CFU/mL。接种后 35 d,NBL-Z1 菌株的定殖量略微下降,为 6.47×10^7 CFU/mL。试验结果表明,哈茨木霉菌能够在草莓根际土壤中定殖和生长繁殖,定殖量呈现先增加后降低的动态变化过程。

2.3 NBL-Z1 菌株对草莓防病促生的作用

由表 2 可知,接种 NBL-Z1 菌株可促进接种根腐病原菌尖孢镰刀菌的草莓生长,提高其产量,降低根腐病发生率。与单接病原菌处理 P 相比,混合接种 NBL-Z1 菌株处理的草莓植株鲜质量、单株产量分别增加 28.17%、25.92%。接种 NBL-Z1 菌株



数据为平均值±标准误,不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著
图3 NBL-Z1 菌株在草莓根表的定殖数量

处理组草莓叶绿素含量显著增加,较单接病原菌组增加 27.89%。

以上结果表明,混合接种 NBL-Z1 菌株不仅能促进草莓生长发育,提高其光合指标,还能有效降低草莓根腐病的发病率,防效为 65.6%。

表 2 接种 NBL-Z1 菌株对草莓生长及产量的影响

处理	植株鲜质量(g)	单株产量(g)	叶绿素含量(SPAD 值)	病情指数	防效(%)
CK	25.10 ± 1.87b	26.47 ± 0.65b	21.93 ± 1.27a	15.1	
P	22.47 ± 0.74c	23.03 ± 0.70c	18.43 ± 0.72b	52.3	
P + NBL-Z1	28.80 ± 0.70a	29.00 ± 1.37a	23.57 ± 1.40a	18.0	65.6

注:数据为平均值±标准误,不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著。

3 讨论与结论

草莓根腐病是草莓生产中的一种主要病害,该病由多种土传病原真菌复合侵染所致^[15-16],其中尖孢镰刀菌是重要的病原菌之一^[17]。近年来,利用微生物防治植物病虫害具有安全、环保、高效等优势已经成为了研究热点。陈哲等研究发现,解淀粉芽孢杆菌 CM3 菌株对尖孢镰刀菌引起的草莓根腐病的防治效果达到了 64.86%^[17]。王占武等的田间试验结果表明,枯草芽孢杆菌 B501 菌株对草莓根腐病的防效高达 94%^[18];Kurze 等研究发现,沙雷氏菌 HRO-C48 菌株可有效降低草莓根腐病的发生^[19]。孙敬祖等研究报道,放线菌 Act12 菌剂对草莓根腐病的相对防效为 84.7%^[20]。除生防细菌和放线菌外,一些真菌如哈茨木霉^[14,21]、钩木霉^[22]等木霉菌对草莓根腐病也具有良好效果。本研究发现,哈茨木霉 NBL-Z1 菌株对尖孢镰刀菌 96 h 的抑菌率可达 100.00%;NBL-Z1 菌株能够在草莓根际土壤中稳定定殖,接种后 28 d,在草莓根表定殖数量为 8.10×10^7 CFU/g;在田间条件下,NBL-Z1

菌株对草莓根腐病具有良好的防治效果,防效为 65.6%。

大量研究表明,木霉菌能促进植株生长,改善植物营养状况^[23-24]。郭成瑾等研究发现,哈茨木霉处理的马铃薯株高、茎粗和分枝数均明显高于对照^[25]。Es-Soufi 等研究发现,哈茨木霉可以促进植物发育并延长其开花和结果的持续时间^[26]。李松鹏等研究报道,哈茨木霉发酵液有利于促进种子发芽与生长的作用^[27]。本试验中,用哈茨木霉 NBL-Z1 无菌上清液浇灌草莓植株,发现处理组的草莓植株鲜质量、单株产量和叶绿素含量分别增加 28.17%、25.92%、27.89%。说明哈茨木霉 NBL-Z1 菌株能够有效促进草莓植株的生长。

本研究结果表明,哈茨木霉 NBL-Z1 无菌发酵滤液对 5 种供试病原真菌有较强的拮抗作用,处理后 96、144 h,NBL-Z1 菌株对尖孢镰刀菌菌丝生长抑菌率均为 100.00%;接种后 28 d,NBL-Z 菌株在草莓根表定殖数量最大,为 8.10×10^7 CFU/g;菌株 NBL-Z1 对草莓根腐病的防效为 65.6%,同时可促进盆栽草莓植株生长,提高果实产量。在接下来

的研究中,我们将检测 NBL - Z1 菌株对根系土壤中其他微生物的影响,并补充相应的田间使用规范等。

哈茨木霉 NBL - Z1 菌株能有效防治草莓根腐病并促进草莓植株生长,具有较高的潜在应用价值。

参考文献:

- [1] Srivastava R K, Singh R K, Prasad R D. Relative antagonistic effect of different isolates of *Trichoderma viridi* and *Trichoderma harzianum* against *Rhizoctonia solani* [J]. National Academy Science Letters, 2012, 35(1): 49 - 52.
- [2] 刘波微, 彭化贤, 陈素清. 番茄灰霉病拮抗木霉菌的筛选及效果评价[J]. 西南农业学报, 2007, 20(4): 650 - 653.
- [3] 康萍芝, 张丽荣, 沈瑞清, 等. 哈茨木霉制剂对设施连作番茄根际土壤微生物的生态效应及防病作用[J]. 农药, 2013, 52(2): 128 - 131.
- [4] 庄敬华, 高增贵, 杨长城, 等. 绿色木霉菌 T23 对黄瓜枯萎病防治效果及其几种防御酶活性的影响[J]. 植物病理学报, 2005, 35(2): 179 - 183.
- [5] 陈建爱, 陈为京, 刘凤吉. 黄绿木霉 T1010 对花生根腐病生防效果研究[J]. 生态环境学报, 2018, 27(8): 1446 - 1452.
- [6] 梁巧兰, 王芳, 魏列新, 等. 深绿木霉 T2 菌株对百合疫霉菌拮抗作用及机制[J]. 植物保护, 2011, 37(6): 164 - 167.
- [7] Bae H, Roberts D P, Lim H S, et al. Endophytic *Trichoderma* isolates from tropical environments delay disease onset and induce resistance against *Phytophthora capsici* in hot pepper using multiple mechanisms [J]. Molecular Plant - Microbe Interactions, 2011, 24(3): 336 - 351.
- [8] Brunner K, Zeilinger S, Ciliento R, et al. Improvement of the fungal biocontrol agent *Trichoderma atroviride* to enhance both antagonism and induction of plant systemic disease resistance[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(7): 3959 - 3965.
- [9] Kubicek C P, Herrera - Estrella A, Seidl - Seiboth V, et al. Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma* [J]. Genome Biology, 2011, 12(4): R40.
- [10] Zhang S X, Sun F F, Liu L J, et al. Dragonfly - associated *Trichoderma harzianum* QTYC77 is not only a potential biological control agent of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* but also a source of new antibacterial agents[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(48): 14161 - 14167.
- [11] Wang Y F, Hou X Y, Jiang C Y, et al. A native *Trichoderma harzianum* strain Th62 displays antagonistic activities against phytopathogenic fungi and promotes the growth of *Celosia cristata* [J]. Horticulture, Environment, and Biotechnology, 2021, 62(2): 169 - 179.
- [12] Swehla A, Pandey A K, Nair R M. Bioactivity of *Trichoderma harzianum* isolates against the fungal root rot pathogens with special reference to *Macrophomina phaseolina* causing dry root rot of mungbean[J]. Indian Phytopathology, 2020, 73(4): 787 - 792.
- [13] 孙广宇, 宗兆锋. 植物病理学实验技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002.
- [14] Vestberg M, Kukkonen S, Saan K, et al. Microbial inoculation for improving the growth ecology, and health of micropropagated strawberry [J]. Applied Soil, 2004, 27(3): 243 - 258.
- [15] 张悦丽, 张博, 任凤山, 等. 草莓腐霉根腐病原菌鉴定[J]. 植物保护学报, 2015, 42(3): 477 - 478.
- [16] Fang X L, Finnegan P M, Barbetti M J. Wide variation in virulence and genetic diversity of binucleate *Rhizoctonia* isolates associated with root rot of strawberry in Western Australia [J]. PLoS One, 2013, 8(2): e55877.
- [17] 陈哲, 黄静, 赵佳, 等. 草莓根腐病的病原菌分离鉴定及拮抗菌 CM3 的抑制作用研究[J]. 生物技术通报, 2018, 34(2): 135 - 141.
- [18] 王占武, 李晓芝, 刘彦利, 等. 枯草芽孢杆菌 B501 在草莓根际的定殖及其动态变化[J]. 植物病理学报, 2003, 33(2): 188 - 189.
- [19] Kurze S, Bahl H, Dahl R, et al. Biological control of fungal strawberry diseases by *Serratia plymuthica* HRO - C48 [J]. Plant Disease, 2001, 85(5): 529 - 534.
- [20] 孙敬祖, 薛泉宏, 唐明, 等. 放线菌制剂对连作草莓根区微生物区系的影响及其防病促生作用[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2009, 37(12): 153 - 158.
- [21] Lamondia J A, Cowles R S. Effect of entomopathogenic nematodes and *Trichoderma harzianum* on the strawberry black root rot pathogens *Pratylenchus penetrans* and *Rhizoctonia fragariae* [J]. Journal of Nematology, 2002, 34(4): 351 - 357.
- [22] Olatimbo R O, Sabaratnam S, Schilder A C. *Trichoderma stromaticum*: a potential biological control agent for black root rot in strawberries [J]. Phytopathology, 2004, 94(6): S78 - S78.
- [23] Harman G E, Howell C R, Viterbo A, et al. *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts [J]. Nature Reviews Microbiology, 2004, 2(1): 43 - 56.
- [24] 叶旻硕, 俞键烽, 马艳, 等. 不同微生物菌剂对辣椒疫病的防控效果及对土壤性状的影响[J]. 江苏农业学报, 2019, 35(4): 811 - 817.
- [25] 郭成瑾, 沈瑞清, 张丽荣, 等. 哈茨木霉协同秸秆对马铃薯黑痣病及根际土壤微生态的影响[J]. 核农学报, 2020, 34(7): 1447 - 1455.
- [26] Es - Soufi R, Tahiri H, Oualkadi's A E, et al. Evaluation of plant growth promoting ability of *Bacillus amyloliquefaciens* Bc2 and *Trichoderma harzianum* TR *in vivo* [J]. Agricultural Sciences, 2020, 11(3): 247 - 259.
- [27] 李松鹏, 崔琳琳, 程家森, 等. 两株哈茨木霉菌株防治水稻纹枯病及促进水稻生长的潜力研究[J]. 植物病理学报, 2018, 48(1): 98 - 107.